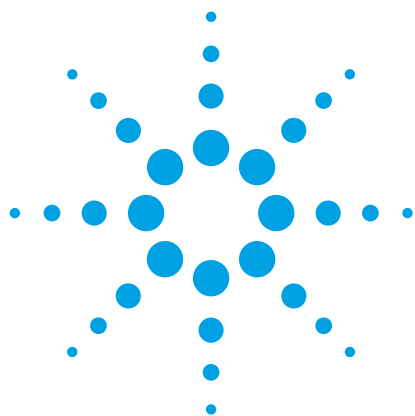




使用安捷伦 GC/Q-TOF MS 和 Mass Profiler Professional 软件表征橄榄油

应用简报

食品检测与农业

作者

Stephan Baumann,
Sofia Aronova
安捷伦科技有限公司
Santa Clara,
加利福尼亚
美国

摘要

本研究建立了一种预测橄榄油能否通过特级初榨感官测试的模型。使用的仪器为安捷伦 7890A GC 和安捷伦 7200 系列精确质量 Q-TOF 质谱联用系统，同时在电子轰击电离源（EI）和正化学电离源（PCI）模式下，检测发现了橄榄油中存在大量的化合物。使用 Mass Profiler Professional 软件进行统计分析并建立分类模型，该分类模型利用 5 种特定化合物可以准确预测一种橄榄油能否通过感官测试。



Agilent Technologies

引言

在美国，对地中海食物和橄榄油健康效应的日益追捧使橄榄油的需求快速增长。到 2013 年，美国市场预期将超过 18 亿美元 [1]。橄榄油被认为与欧洲南部人口的长寿和心脏病低发病率有关。事实上，食品与药品管理局（FDA）已经批准橄榄油中单不饱和脂肪酸降低冠心病风险的健康声明。最近有研究表明，橄榄油的消炎作用主要来源于第一次压榨得到的特级初榨橄榄油（EVOO），很少有食物含有如此丰富的抗氧化物和消炎成分。

国际橄榄油理事会（IOC）和美国农业部（USDA）已经建立了 EVOO 的分类标准，包括由品鉴小组进行的感官测试和化学测试。然而，最近的研究 [2] 表明，占美国 EVOO 市场 99% 的进口橄榄油往往通不过 EVOO 类别的感官测试，加之感官测试是昂贵和主观的。

基于美国市场 EVOO 强大的市场份额和对 EVOO 日益增长的需求，非常值得开发一种可以预测橄榄油能否通过感官测试的化学筛查法。这样，生产厂商只需提交那些通过率高的橄榄油产品进行感官测试。这样的化学筛查同样可以降低鉴别和认证的费用和时间，同时提高市场上 EVOO 的品质。

该应用报告证明了开发一种模型预测橄榄油能否通过感官测试的可行性。该模型使用一种类似于近期红酒分类报告 [3] 中应用的非目标化合物分析方法，同时采用电子轰击电离源（EI）和正化学电离源（PCI）模式采集数据，使用安捷伦 7890A GC 和安捷伦 7200 系列精确质量 Q-TOF 质谱联用系统，安捷伦 MassHunter 软件用于谱图的解卷积，Mass Profiler Professional（MPP）软件用于深度统计分析和建立分类模型。橄榄油样品中的 5 种特定化合物与感官测试失败有关。

实验

试剂和标准品

环己烷，色谱纯，来自 Sigma-Aldrich 公司。

样品

一共 10 种橄榄油样品均来自 UC Davis Olive Center。所有样品均接受了由 IOC 授权小组执行的感官测试确定它们是否符合 EVOO 标准。样品室温下避光保存，用环己烷按 1:10 的比例进行稀释，以 1:10 分流比进样到气相色谱中，按随机顺序进行分析。

仪器

研究使用的仪器是安捷伦 7890A GC 和安捷伦 7200 系列 GC/Q-TOF 联用系统。仪器的操作条件列于表 1。

表 1. GC 和 MS 仪器条件

GC 仪器参数设置	
色谱柱	DB-5 MS, 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m (部件号 122-5532)
进样量	1 μ L
MMI 进样口	50 °C 保持 0.01 min, 600 °C/min 升到 300 °C
吹扫分流出口	60 mL/min @ 1 minute
柱箱升温程序	45 °C 保持 4.25 min, 5 °C/min 升到 75 °C, 保持 0 min, 再以 10 °C/min 升到 320 °C, 保持 10 min
载气	氦气, 1.3 mL/min 恒流
传输线温度	290 °C
MS 仪器参数设置	
离子化模式	EI, 正 CI (20% 甲烷气体)
离子源温度	230 °C
四极杆温度	150 °C
m/z 范围	40 ~ 800 m/z
质谱采集速率	5 Hz, 同时以曲线图模式和棒状图模式采集

数据处理和统计分析

使用 MassHunter 定性分析软件 (版本 B.05 SP1) 进行数据处理, 其中的谱图解卷积工具用于色谱峰定性。通过调整质量和化合物过滤器, 可以鉴定 100~300 个化合物。使用 MassHunter 的输出工具创建 CEF 文件将解卷积数据输入到 MPP。

使用 Mass Profiler Professional 软件 (版本 2.1.5) 进行统计分析, 数据处理步骤如下:

1. 设置导入过滤器和对齐参数
2. 选择归一化准则
3. 定义样品组
4. 设置数据过滤器
5. 用主成分分析 (PCA) 图对数据进行聚类评估

一旦这些步骤完成后, 就使用倍率变化和显著性分析等统计工具对数据进行评估。最后的分析步骤是建立和测试分类模型。进一

步的数据处理还包括使用质谱数据库检索和分子式估算排布对化合物进行定性。

结果和讨论

数据采集和处理

使用 GC/Q-TOF 对 EV00 样品中的化合物进行鉴定。使用 MassHunter 中的谱图解卷积 (图 1) 通常情况下可识别大约 150 个色谱峰。使用冷柱头分流进样, 进样口温度从 50 °C 程序升温至 300 °C, 将热分解降至最低。为了能较好分离早出峰的化合物, 将柱温箱初始升温速率设为 5 °C/min。

使用 MassHunter 的解卷积对色谱峰进行识别, 然后利用 MassHunter 的输出工具生成可以导入到 Mass Profiler Professional (MPP) 软件的 CEF 文件。

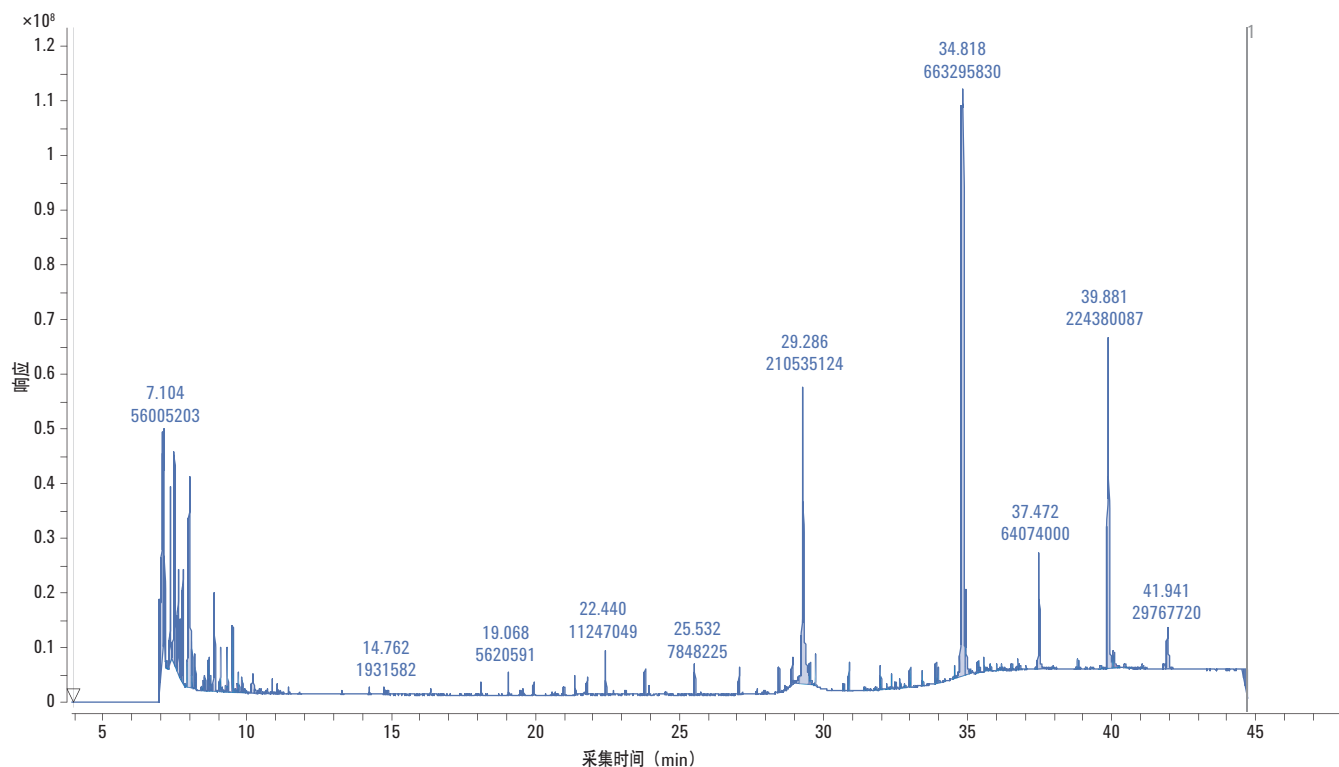


图 1. 通常情况下, 利用谱图解卷积可以识别约 150 个色谱峰, 峰面积筛选器为最大峰峰面积的 0.1%

MPP 软件匹配了以谱图类型和保留时间为基础的提取离子色谱 (EICs)。提取离子谱图要求交叉相关系数为 0.6，保留时间匹配到 0.05 min，才认为是同一个化合物。图 2 中的质量和保留时间曲线显示橄榄油中共识别出 442 个独特的实体（化合物），它们中的大多数只出现过 1 到 2 次，并且在数据过滤时被筛选掉。

定义了样品组后，在 MPP 中设置数据过滤器。实体过滤可以生成更高质量的数据集，使后续多元分析更有意义。第一次过滤确定了哪些实体（化合物）100% 时间都在至少一个样品组中出现（频率分析）。该频率过滤器将初步标记物从 442 个降到了 91 个。

统计分析

当使用复杂的统计软件经编写以处理 ASCII 或文本类型的结果时，标记物发现的统计分析往往会非常繁琐和费时。MPP 软件是有效利用复杂而“嘈杂”的数据，进行复杂的数据管理、筛选、统计分析、解释、模型创建和预测的理想选择。它提供了一个易于遵循的指导工作流程，帮助用户决定如何最好地去评估数据。专家级用户可以直接进行所需的数据处理（详情见 Mass Profiler Professional 产品样本 5990-4164CHCN）。

主成分分析 (PCA) 是一种经常采用的非监督多元分析技术，它可对数据进行降维处理，同时保留数据中的鉴别能力。

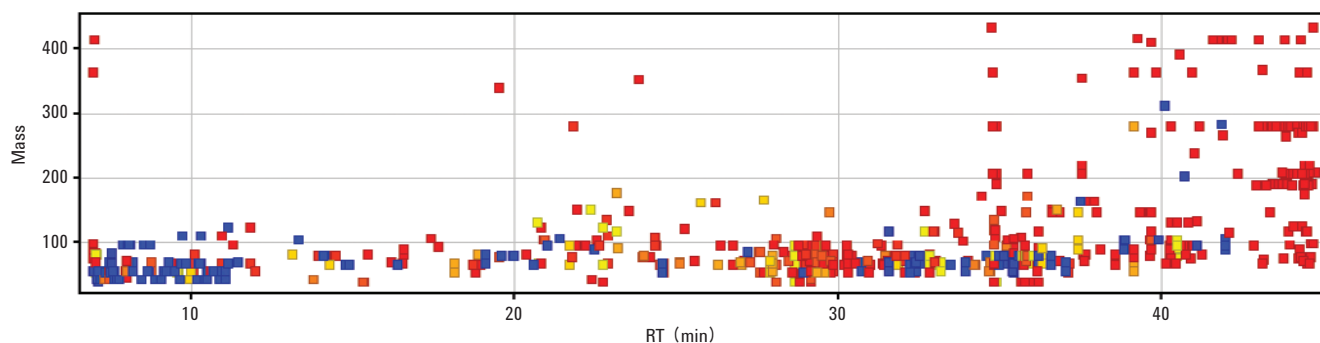


图 2. 质量和保留时间曲线表明经谱图解卷积识别了 442 个独特的化合物。它们中的大多数只出现过 1 到 2 次，会被 MPP 过滤掉。低频的化合物以红色表示，高频的以蓝色表示

PCA 通过把测量的变量转化为不相关的主成分，每个主成分是一个原始变量的线性组合。它作为一种质量控制工具，分析数据如何聚类并确定离群样本。实体（化合物）PCA 在通过和未通过感官测试样品之间分析数量上的不同，进一步确定了数据分组的差异性（图 3）。

倍率变化和统计学意义

一旦确定了橄榄油样品通过和未通过感官测试这两大分类，即进行统计学分析。首先，测定任何指定化合物的浓度倍率变化（上升），这项分析识别选定数组之间丰度差异大的实体（化合物），即通过和未通过的 EVOO 样品中那些浓度相差 2 倍、3 倍、4 倍或更多的实体（化合物）。

下一步，利用方差分析（ANOVA）确定那些满足倍率变化标准的化合物间是否具有统计学上显著性差异。使用概率值 $P=0.01$ ，频率筛选得到的 91 个实体减少到 5 个重要化合物。倍率变化分析和 ANOVA 分析的结果以火山曲线（图 4）表示。选定 P 值最低和倍率变化最大的 5 个化合物用于创建分类模型。

分类模型

分类的目的是以几个变量描述并且已知分类信息识别的一套训练样品为基础，建立一种一般性假设。任务是通过前者映射后者。为实现此目的，大量基于统计或人工智能的技术被开发出来 [4]。本研究的目的就是以 5 种与不能通过感官测试有关的化合物为基础预测哪个橄榄油样品不能通过感官测试。

偏最小二乘（PLS）分析尤其适合于这种观察对象，这里指样品数量比测量变量（如检测实体， m/z ）少的情况。因为它具有处理大量相关及嘈杂变量的能力，应用越来越广泛。偏最小二乘判别分析法（PLSDA）用于锐化不同观察组别之间的分区，从而获得最大化的分类，已经成为代谢组学数据分类强有力的工具 [4]。因此，PLSDA 被用于建立橄榄油分类模型。

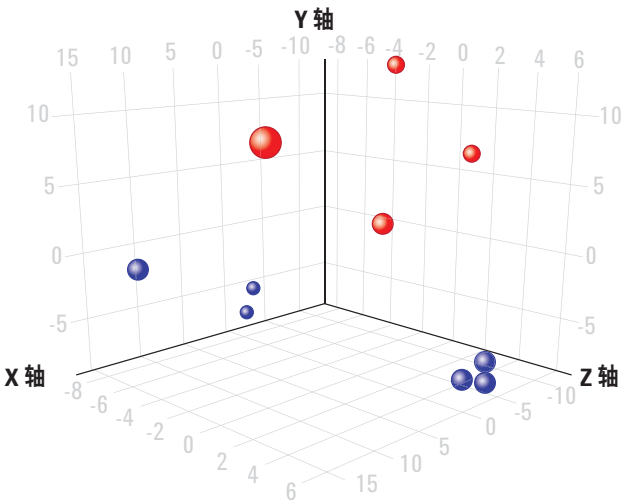


图 3. 主成分分析 (PCA) 显示数据如何聚类。红色表示未通过感官测试的样品，蓝色表示通过感官测试的样品

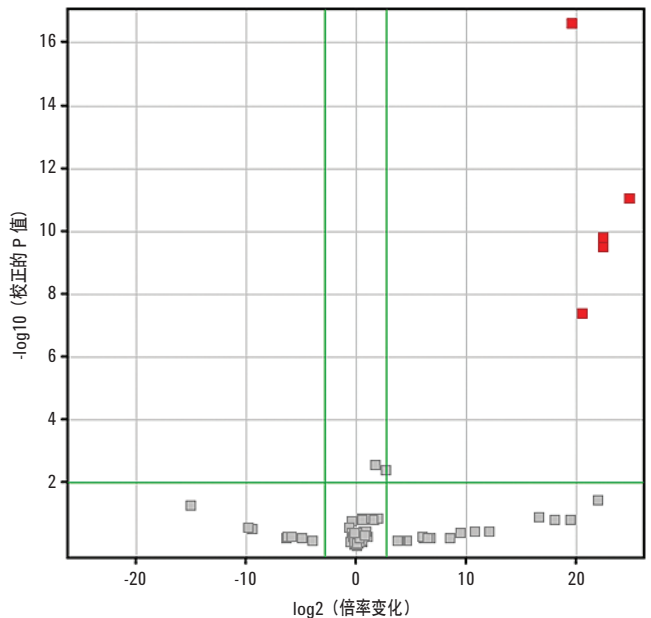


图 4. 火山曲线表示了 X 轴上每个实体的倍率变化和在 Y 轴上的显著性差异。这 5 种化合物聚积在未通过感官测试的样品中

根据 MPP 筛选出的 5 种化合物将数据分为 2 类，下一步是创建一个模型来预测一种橄榄油样品能否通过感官测试。建立分类模型的第一步是用数据对模型进行训练（图 5）。

为测试模型，要使用相同但未包括在创建模型中的训练数据和样品，虽然有些多余，但这是一个有效的统计过程。采用同样的分类预测模型验证训练模型。包括那些不用于构建模型的有限数量的样品，模型的准确度均为 100%（图 6）。这些结果表明了创建一个模型用于准确预测一个 EV00 样品能否通过感官测试的可行性。

Identifier	Training	Predicted(Training)	Confidence
CSC1-EI-1: Ig2	[F, Training]	[F, Training]	1.000
FSW2-EI-1: Ig2	[F, Training]	[F, Training]	1.000
ESC1-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000
ESC2-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000
RSA1-EI-1: Ig2	[P, Training]	[P, Training]	1.000

图 5. 代表了 PCA 中 3 个聚类的 PLSD 训练集

Prediction Results					⌵
Identifier	Grade	Training	Predicted(Class Pre...	Confidence	
PAC1-EI-1: Ig2	F	None	[F, Training]	1.000	
ESC2-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
ESC1-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
SAC1-EI-1: Ig2	F	None	[F, Training]	1.000	
RFC2-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
RSA2-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
CSC1-EI-1: Ig2	F	Training	[F, Training]	1.000	
RSA1-EI-1: Ig2	P	Training	[P, Training]	1.000	
EFC1-EI-1: Ig2	P	None	[P, Training]	1.000	
FSW2-EI-1: Ig2	F	Training	[F, Training]	1.000	

图 6. 模型准确预测了所有样品的通过与否，包括那些未参与模型创建的样品，这些样品没有用于构建预测模型，在“Training”变量中以“None”表示

化合物定性

安捷伦 7200 系列 GC/Q-TOF 这类仪器的优势在于可以以 EI、CI 和产物离子扫描模式采集数据。这些正交操作模式有助于信息确认。EI 可以进行谱库检索并提供碎片数据；CI 可以提供经验公式方面的信息；产物离子 MS/MS 扫描生成的数据可用于精确质量的子结构检索，应用到 EI 或 CI 产物离子上。

然而，没有必要知道分类模型中使用的化合物是什么，但化合物鉴定可以了解那些化学组分直接或间接对橄榄油感官质量产生副作用的机理。安捷伦 7200 系列 GC/Q-TOF 可以提供精确质量的结构信息，对化合物鉴定 (ID) 具有强大的优势。

使用安捷伦 MassHunter 定量软件进行精确质量谱图解卷积并从干扰峰中提取干净谱图。然后，根据 NIST 数据库对 EI 质谱数据进行检索（图 7）。除了最后一个化合物，所有 EI 数据均发现有相应的匹配度。虽然碎片形成模式是一样的，但和四极杆仪器得到的数据相比，该匹配因子相对较低，因为 NIST 谱库中大部分数据均来自于四极杆质谱。这两种质谱仪在不同的质量范围内体现的最佳性能各有不同：四极杆质谱的响应在低质量范围内优于飞行时间质谱。

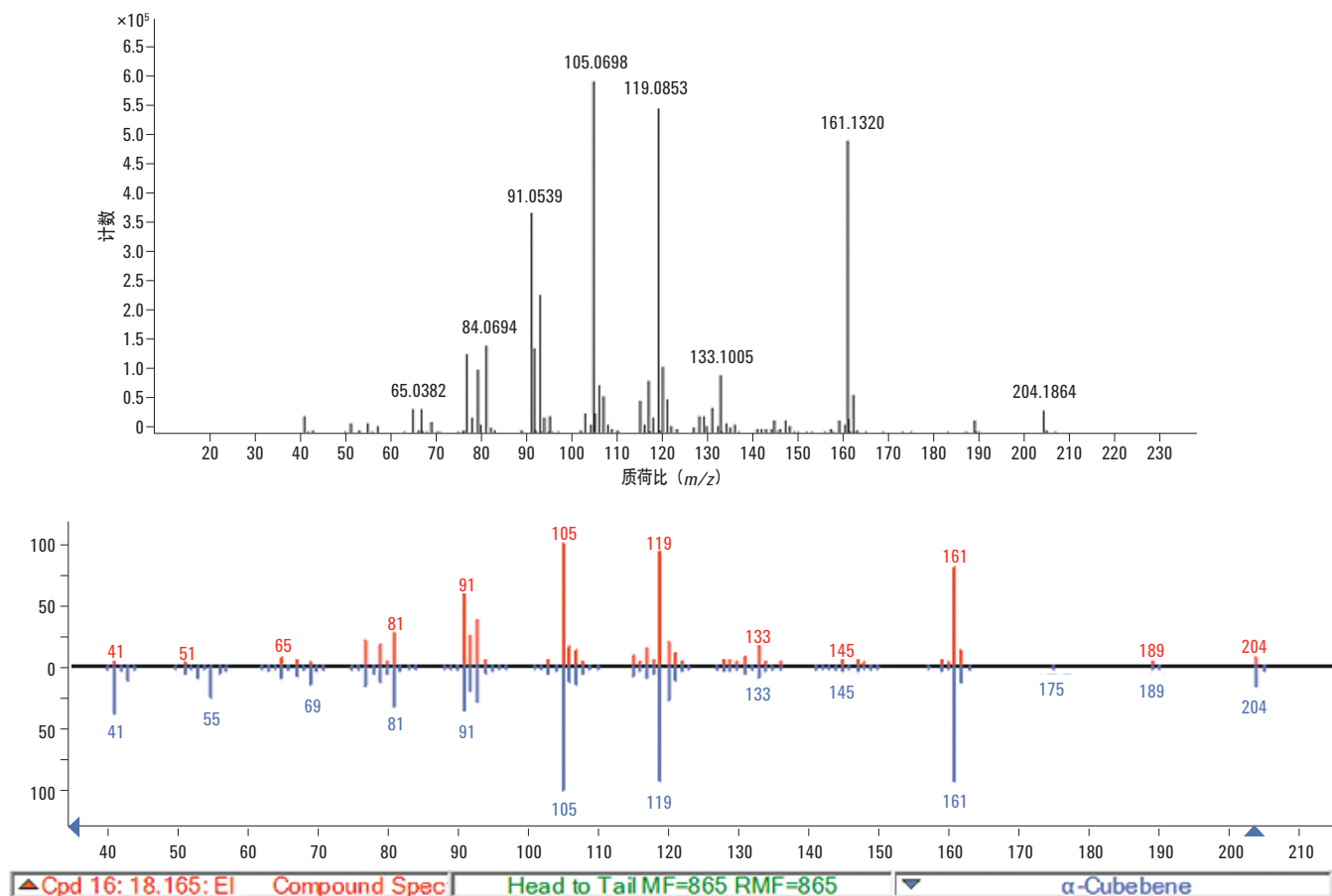


图 7. EI 商业谱库如 Wiley 和 NIST 可以进行精确质量 EI GC/Q-TOF 数据检索确定化合物

EI 离子的精确质量信息有助于聚积化合物的初步定性，除了一个缺少主导分子离子的化合物外（图 8），对其他所有化合物质量准确度均低于 5 ppm。

利用正 CI 精确质量数据，每个标记物都可以生成分子式（图 8）。根据观察到的碎片形成模式，数据对第 5 个化合物（最底行）的分子式进行了确认。除了 227 m/z 处的预期峰和它的 ($M+C_3H_5$) + PCI 加合物外，还观察到一个 209 m/z 的碎片峰，这和丢失 H_2O 分子的结果一致。191 m/z 的碎片峰的形成表明了第二个水分子的丢失。从这些数据可以推测该化合物为一个经验分子式为 $C_{14}H_{26}O_2$ 的二醇类物质，它的质量准确度正好大于 8 ppm，符合低信号强度。对 NIST 谱库检索确定的另外 4 种化合物的研究表明，它们都具有影响橄榄油味道的气味，从而导致无法通过感官测试（图 9）。

MPP ID	初步 NIST 检索 ID	NIST 匹配度	分子式	CAS	EI, M^+			PCI, $[M+H]^+$		
					计算值	测定值	质量偏差 (ppm)	计算值	测定值	质量偏差 (ppm)
55.0@27.546	n-棕榈酸	789	$C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3	256.2397	256.2385	4.7	257.2475	257.2470	1.9
73.0@29.750	硬脂酸乙酯	703	$C_{20}H_{40}O_2$	111-61-5	312.3023	312.3008	4.8	313.3101	313.3091	3.2
81.0@35.731	角鲨烯	831	$C_{30}H_{50}$	111-02-4	410.3907	410.3904	0.7	411.3985	411.3987	0.5
105.0@20.906	α -葎澄茄油烯	880	$C_{15}H_{24}$	17699-14-8	204.1873	204.1883	4.9	205.1951	205.1945	2.9
71.0@27.260	NIST 谱库不存在	N/A	$C_{14}H_{26}O_2$	N/A	226.1927	ND	ND	227.2006	227.1987	8.4

图 8. PCI 质谱数据提供了精确质量信息，用于确定积聚在未通过测试的橄榄油样品中的化合物的分子离子。最下一行是在 EI 谱图中没有发现主导性分子离子碎片的化合物信息

MPP ID	初步 NIST 检索 ID	NIST 匹配度	分子式	CAS	气味	来源
55.0@27.546	n-棕榈酸	789	$C_{16}H_{32}O_2$	57-10-3	淡油	Bedoukian Research
73.0@29.750	硬脂酸乙酯	703	$C_{20}H_{40}O_2$	111-61-5	蜡	Good Scents 公司
81.0@35.731	角鲨烯	831	$C_{30}H_{50}$	111-02-4	花香	Good Scents 公司
105.0@20.906	α -葎澄茄油烯	880	$C_{15}H_{24}$	17699-14-8	草药香	Good Scents 公司

图 9. 4 种和感官测试失败有关的化合物气味列表

使用 Molecular Structure Correlator 进行结构确认

Q-TOF 产物离子谱图可以帮助确认所有生成的碎片离子和所提议的结构异构体建立联系。Molecular Structure Correlator 可以对子结构进行 ChemSpider 数据库检索并且将结果和所有可能的异构体建立联系。每个碎片离子按与建议分子式的质量误差和生成该建议分子式需要断裂多少个化学键的罚点排序。将每个碎片离子的得分加权平均，同时考虑每个碎片离子的强度和质量数，得到一个异构体的个体兼容性评分（Compatibility Score）（图 10）。

该工具作为 EI 谱库的补充，清晰地鉴定出 29.75 min 的峰为一种乙酯类化合物，最佳匹配化合物为硬脂酸乙酯。Molecular Structure Correlator 表明，312 m/z 母离子的产物离子和硬脂酸乙酯有很好的相关性，兼容性评分为 98（图10）。此外，碎片的精确质量和建议质量相关性良好，所有碎片的质量误差在 5 ppm 之内，这为化合物鉴定提供了额外的确认信息。

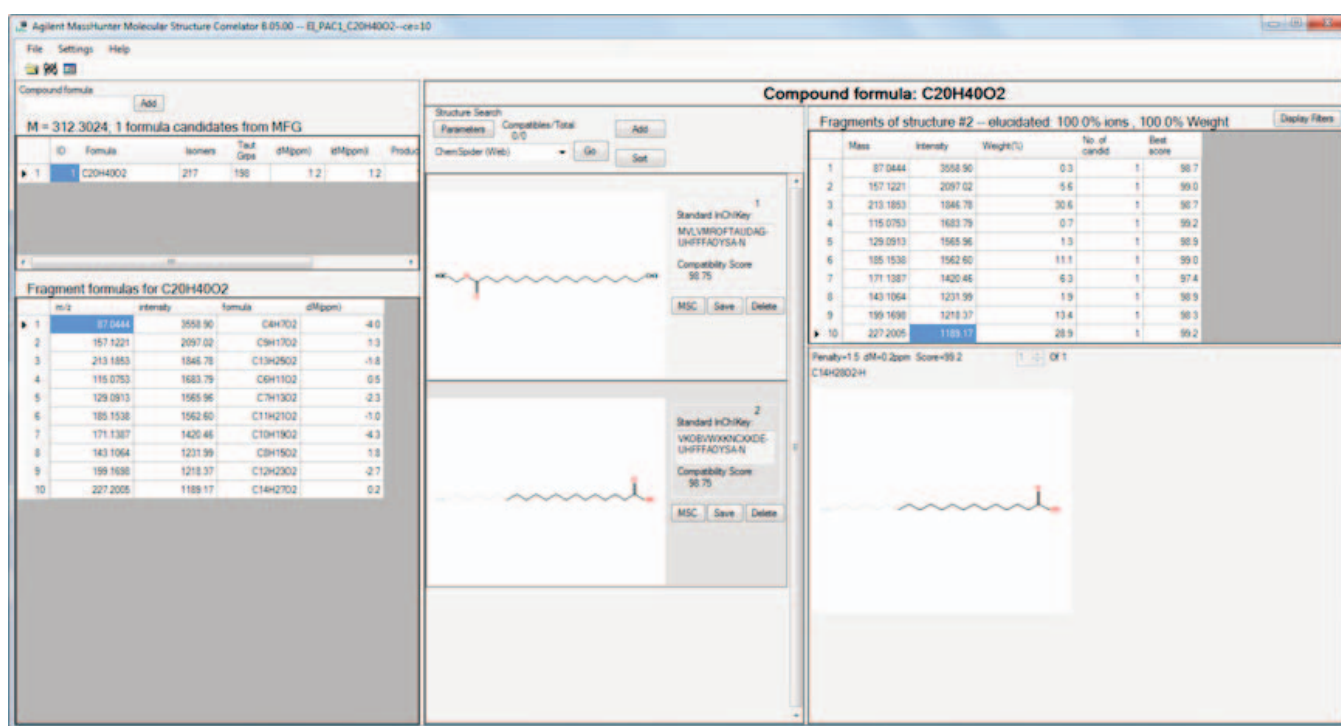


图 10. Molecular Structure Correlator 将 Q-TOF 产物离子的谱图和结构异构体经验公式的谱图相比，确定哪个产物离子和异构体的碎片相关，从而得出兼容性评分

结论

使用 Agilent GC/Q-TOF 系统的精确质量 EI 源和正 CI 源扫描数据建立了一个模型，用于准确预测一种橄榄油样品是否能够通过感官测试。虽然只是使用小样本创建的模型，但也充分证明了这种方法的可行性。使用增大的样本量构建的预测性模型将为橄榄油厂商提供一种经济、快速的测试方法预测他们的产品能否通过感官测试，从而，避免了对劣质油进行感官测试花费的时间和金钱。对没有通过感官测试的 EVOOs 中聚积化合物的识别与通过味道识别劣质橄榄油一样可靠。这种方法还可以被创造性地用于构建另一种模型，以预测一种橄榄油是否被掺杂了廉价替代品。

参考文献

1. Olive Oil in the U.S., 3rd Edition, Apr 1, 2009, a marketing report from Packaged Facts (<http://www.packagedfacts.com/Olive-Oil-Edition-2071654/>)
2. E. N. Frankel, R. J. Mailer, C. F. Shoemaker, S. C. Wang, J. D. Flynn, "Tests indicate that imported "extra virgin" olive oil often fails international and USDA standards" UC Davis Olive Center, July 2010 (<http://olivecenter.ucdavis.edu/news-events/news/files/olive%20oil%20final%20071410%20.pdf>)
3. L. Vaclavik, O. Lacina, J. Hajslova, J. Zweigenbaum. "The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety.", *Anal Chim Acta*. **685**, 45-51 (2011)
4. J. Boccard, J. L. Veuthey, S. Rudaz. "Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling." *J Sep Sci*. **33**, 290-304 (2010)

更多信息

此数据仅代表典型结果，有关我们产品和服务的更多信息，请访问 www.agilent.com/chem/cn。

www.agilent.com/chem/cn

安捷伦对本资料可能存在的错误或由于提供、展示或使用本资料所造成的间接损失不承担任何责任。

本资料中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2012
2012 年 3 月 23 日，中国印刷
5991-0106CHCN



Agilent Technologies